

Ein neuer Weg zur Typisierung
von Proteus Rettgeri

Brigitte Hellinger



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555626_0002

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. H. Eyer

EIN NEUER WEG ZUR TYPISIERUNG VON PROTEUS RETTGERI

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

B r i g i t t e H e l i n g e r

aus

Ebersberg

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der

Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. A. Bauernfeind

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Dezember 1977



Gliederung

A Einleitung

B Material und Methoden

I. Material

1. Stämme

- a) *Proteus rettgeri* Japan
- b) *Proteus rettgeri* München
- c) Stämme für Wirtsspektrum

2. Medien

3. Antibiotica, Mitomycin C

II. Methoden

1. Bestimmung der Mitomycinresistenz

2. Nachweis von Hemmsubstanzen mit Ausstreichmethode

3. Bestimmung des Hemmstofftiters flüssiger Producerkulturen

4. Ausschluß von Bakteriophagen

- a) Ausstreichmethode
- b) Diffusion
- c) Gefriertrocknung

5. Aktivitätsspektrum

- a) Stämme
- b) Methode

C Ergebnisse

1. Mitomycinresistenz der Teststämme
2. Bakteriozinsynthese und - sensitivität bei
Proteus rettgeri
3. Charakterisierung der Hemmsubstanz
 - a) Hemmspektren
 - b) Bakteriophagenausschluß
 - aa) Ausstreichmethode
 - bb) Diffusion

D Diskussion

E Zusammenfassung

A Einleitung

Gramnegative Keime stehen bei Harnwegsinfekten im Vordergrund (9). Sie gelangen aus dem Keimreservoir Intestinaltrakt ascendierend oder haematogen zum Infektionsort (Selbstinfektion, 16). Daneben kommt es zur Infektion der Harnwege durch Instrumentieren mit keimtragenden Materialien. Hierbei stammen die Erreger aus dem Klinikmilieu (Kreuzinfektion, 3, 17, 25, 27, 28, 30, 47, 61, 75, 76, 80). Statistiken aus dem Boston City Hospital zeigten z.B., daß bei 2 - 4% aller Frauen nach einer einzigen Katheterisierung ein Harnwegsinfekt nachweisbar war, nach Dauerkatheter sogar bei 98% (53, 55). Berichte aus dem Binnen Gasthuis Amsterdam geben an, daß allgemein 20% der Frauen beim Katheterisieren infiziert werden (65).

15 - 20% der Harnwegsinfekte werden derzeit durch Proteusarten verursacht (7, 9). Früher wurden diese Bakterien so selten aus Urinproben isoliert, daß sie dort als fast harmlos galten (65). Ihre Häufigkeit im Bereich der Harnwege nimmt weiter zu (77, 86). Hauptursache ist das ungezielte Einsetzen von Antibiotika (22, 26, 69, 70).

Innerhalb der Gattung Proteus tritt neuerdings eine Spezies stärker in den Vordergrund: *P r o t e u s r e t t g e r i*.

Sie ist meist vielfach chemotherapieresistent (6, 7, 43, 64, 70, 82, 83). Das Resistenzverhalten wird dabei überwiegend determiniert von R-Faktoren (7, 8). Geht die Entwicklung in gleichem Tempo weiter, könnte *Proteus rettgeri* als Hospitalkeim, vor allem im Bereich der Harnwegsinfekte in der modernen Klinik bald die Häufigkeit von *Pseudomonas aeruginosa* erreicht haben (29).

Wesentlichste Voraussetzung für den Ausschluß oder wenigstens das Zurückdrängen von Hospitalinfektionen ist die Kenntnis von Keimreservaten und Infektionsorten. Dazu ist eine möglichst präzise Charakterisierung isolierter Erreger unerlässlich. Zuordnung nach Gattung und Art wie in der Praxis bakteriologischer Routinediagnostik üblich, ist hierfür völlig unzureichend. Für fundierte epidemiologische Aussagen ist sie zu ergänzen durch Typendifferenzierung u n t e r h a l b des Artniveaus. Dafür kommen zur Zeit die folgenden Merkmale in Frage:

- a) Fermentative, biochemische Leistungen (Biotyp),
- b) Antigenstruktur (Serotyp),
- c) Verhalten gegenüber Bakteriophagen (Lysotyp).

Diese Typisierungsmöglichkeiten sind nicht bei allen Spezies gleichgut zugänglich und ergiebig.

In seltenen Fällen sind b i o c h e m i s c h e Marker von epidemiologischer Relevanz (7, 8, 68). Meist läßt sich mit fermentativen Leistungen allein eine Spezies nur unbefriedigend subklassifizieren. Ähnlich leicht zugänglich, aber besser auflösend, ist die S e r o t y p i e , am bedeutungsamsten bei Salmonellen (wo bekanntlich Arten durch Serotypie abgegrenzt werden). Andere Spezies sind per serologischer Analyse bislang weniger umfassend klassifiziert. Dazu zählt auch *Proteus rettgeri* (63, 68).

Eng begrenzt ist noch die Verwendbarkeit der L y s o t y p i e als epidemiologisches Werkzeug, und zwar im wesentlichen auf die Genera *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Staphylokokkus*. Ansätze für Lysotypie bei *Proteus rettgeri* wurden von uns gemacht (7, 8).

Die Zahl der Fälle, bei denen eine Typisierung bakterieller Erreger aus Klinikmilieus mit Hilfe von B a k t e r i o z i n e n notwendig wird, nimmt in der epidemiologischen Praxis ständig zu (84, 8). Ein Hemmstoff dieser Art wurde zum erstenmal 1925 von André GRATIA, einem belgischen Forscher, beschrieben als ein Fall von Antagonismus zwischen zwei Stämmen von *Escherichia coli* (42). Das bakterienfreie Filtrat einer Bouillonkultur des einen hemmte die Vermehrung des anderen Stammes. GRATIA (44, 49) erkannte als Ursache eine antibiotische Substanz. Sie war noch bei einer Verdünnung

von 10^{-3} wirksam, thermostabil, diffundierte leicht in Agar, durchdrang Zellophan, war resistent gegen Chloroform und präzipitierbar mit Aceton. GRATIA bezeichnete diese Substanz als Prinzip V, das heutige Colocin V, benannt nach dem virulenten der beiden E. coli-Stämme. Die letztere Bezeichnung wurde von GRATIA und FRÉDÉRICQ 1946 eingeführt.

Nach GRATIA hat vor allem FRÉDÉRICQ die Kenntnis über die Colicine bedeutend vermehrt (32 - 40). Zunächst wurden hauptsächlich E. coli-Stämme auf die Bildung dieser antibiotischen Substanzen hin überprüft. Bald wurden jedoch auch bei anderen Spezies Substanzen gefunden, die den Colicinen analog waren, z.B. bei *Pseudomonas aeruginosa*. Man ging daher in der Nomenklatur auf die allgemein gültige Bezeichnung Bakteriozin über und nannte Bakterien, die diese Substanzen produzierten, bakteriozinogen (52). Die Hemmstoffe selbst werden benannt nach der sie produzierenden Art, also Pyocine von *Pseudomonas pyocyanea* (heute richtiger *Aeruginocine*), Cloacine von *Enterobacter cloacae*, Pesticine von *Yersinia pestis*. Voraussetzung für die Zuordnung einer Hemmsubstanz zu den Colicinen ist die Erfüllung einer Reihe von Kriterien (13). Sie gelten im Prinzip auch für Bakteriozine anderer Spezies. Wesentliche gemeinsame Eigenschaften sind:

1. Ein charakteristisches Wirkungsspektrum. Es umfaßt immer Stämme aus der gleichen Art, welcher der Produzent zuge-

hört, darüber hinaus nur Stämme nahe verwandter Arten.

2. Spezifische Adsorption an die Oberfläche der Bakterienzelle als Voraussetzung der Hemmwirkung. Gegen ein bestimmtes Bakteriozin mutativ resistent gewordene Bakterien adsorbieren es nicht mehr, da sie die spezifischen Rezeptoren verloren haben (37, 57, 79). Sie können aber gegen ein anderes Bakteriozin sensibel bleiben (36). Tolerante Bakterien dagegen besitzen Rezeptoren und werden aber trotzdem nicht abgetötet. Ursache dürfte ein für die Inaktivierung erforderlicher Faktor zwischen Rezeptor und "target" sein (62).
3. Langsame Diffusion in Agar. Sie wird erkennbar auf Rasen sensitiver Kulturen. Die Hemmzonen verschiedener Bakteriozine können dort charakteristisch ausgeprägt sein. Sie liefern so ein wichtiges Merkmal zur Klassifizierung der Bakteriozine (56).
4. Thermolabilität; die meisten Bakteriozine werden bei 60°C innerhalb 30 Minuten inaktiviert.
5. Elektrophoretische Motilität: Jedes Bakteriozin hat eine charakteristische Beweglichkeit im elektrischen Feld (17).
6. Chloroformresistenz gilt für die meisten Bakteriozine (33).
7. Empfindlichkeit gegen proteolytische Enzyme: Trypsin, Pepsin und bakterielle Proteasen (32).
8. Immunogenität (56): Durch Immunisierung von Tieren mit Bakteriozinen kann man Antikörper gewinnen, die sie

spezifisch neutralisieren und präzipitieren.

Bisher hat man bei einer großen Zahl von Bakterienarten Bakteriozinbildung nachgewiesen, gramnegativer wie grampositiver: *Pseudomonas aeruginosa* et *fluorescens* (23, 41, 50, 56, 45, 46), *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* (24), *E. hafniae*, *Proteus vulgaris*, *mirabilis*, *morgani*, *Pasteurella pseudotuberculosis*, *Brucella* sp., *Streptococcus pyogenes*, *viridans* (81), *lactis*, *faecalis*, *faecium* (14, 54), *Staphylokokkus aureus* et *albus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus* und *B. subtilis* sowie *Clostridium perfringens* et *sporogenes* (72). Bei einigen Stämmen ist bereits ein Typisierungsschema ausgearbeitet worden:

- a) *Shigella sonnei* (1, 2),
- b) *E. coli* (73, 67, 59),
- c) *Pseudomonas aeruginosa* (9a, 23, 41, 50),
- d) *Serratia marcescens* (84),
- e) *Proteus* (21).

CRADDOCK-WATSON fanden bei 61% von *Proteus mirabilis* und bei 10% von *Proteus vulgaris* Bakteriozinbildung. Das Wirkungsspektrum beschränkte sich auf die eigene Art. In ihren allgemeinen Eigenschaften stimmen ihre Bakteriozine mit den Colicinen überein.

Die zunehmende Häufigkeit der Infektionen mit vielfach resistenten Stämmen von *Proteus rettgeri* in Klinikmilieus (1, 3, 4, 6, 7, 17, 18, 19, 20, 27, 30, 31, 34, 41, 42, 68, 26, 43), machten auf die bislang unbefriedigenden Möglichkeiten der mikrobiologischen Analyse dieser Spezies aufmerksam (7, 68). Dem Problem der Subklassifizierung von *Proteus rettgeri* kommt aus klinisch-epidemiologischer Sicht größte Bedeutung zu. An anderer Stelle wurde die Serotypie dieser Spezies erneut aufgegriffen (68). Bakteriozine wurden laut BERGEY (1975, 15) bei *Proteus rettgeri* bislang nicht nachgewiesen. CRADDOCK (20) hat bei zwei Stämmen Hemmsubstanzen gefunden (1971), bei denen wesentliche Kriterien für Bakteriozine gegeben waren. Daraus Schlüsse auf Bakteriozinsynthese bei *Proteus rettgeri* im allgemeinen zu ziehen, ist insofern unzulässig, als das von CRADDOCK bearbeitete Stammmaterial nur sieben Isolierungen umfaßte. Wir stellten uns deshalb die folgenden Aufgaben: Bei einer großen Zahl typischer Stämme der Spezies *Proteus rettgeri*

1. Hemmsubstanzen von bakteriozin- oder bakteriozinähnlichem Charakter zu finden,
2. falls der Nachweis derartiger Substanzen gelingen sollte, eine Bakteriozintypie nosokomialer Stämme dieser Spezies zu erreichen.

B. Material und Methoden

I. Material

1. Stämme

- a) *Proteus rettgeri* Japan, Serotypen von Dr. Shigeo
Namioka (63)

Stamm	Serotyp
	0:H
J1	3:1
J3	5:3
J4	6:4
J15	7:5
J8	10:7
J9	11:16
J10	12:1
J11	13:1
J13	15:21
J14	32:18
J21	28:-
J22	20:15
J23	19:2
J24	16:-
J25	22:15
J32	22:15

J36	7:6
J38	23:1
J42	24:12
J43	1a,1c:2
J44	25:20
J45	21:9
J46	17:C1:-
J50	26:22
J51	33:4
J52	26:1
J55	17:C1:-
J56	27:8
J57	Rough
J58	28:23
J67	29:4
J68	30:14
J74	34:25
J75	31:19
J86	16:2
J87	22:1
J90	2a,2b:13
J91	16:2
J95	2a:2

Proteus rettgeri ATCC 9918;

Isolierungen aus Untersuchungsproben des Max von Pettenkofer-Institutes, München: M 64, M 121, M 198

b) *Proteus rettgeri* München:

Ein erstmalig im Münchner Klinikbereich isolierter, neuer
Typ von *Proteus rettgeri* (7, 8).

Typische Stämme (in Bio- übertragbare Resistenzdeter-
Sero- und Lysotyp überein- minanten
stimmend)

Tab.: 1	+)		CML Kan/Neo	Stre	Sid	Ana Amp Ceph
M2	-	-	-	+	+	
M11	-	-	-	+	+	
M43	+	+	+	+	+	
M103	-	-	-	+	+	
M115	-	-	-	-	+	
M116	+	+	+	+	+	
M313	-	-	-	+	+	
M317	-	-	-	+	+	
Nur in Bio- und Serotyp übereinstimmende Stämme						
M69	+	+	+	+	+	
M 318	-	+	-	+	+	
Nur in Bio- und Lysotyp übereinstimmende Stämme						
M33	+	+	+	+	+	
M70	-	-	-	-	-	
Nur in Biotyp übereinstimmende Stämme						
M1	-	-	-	+	+	
M200	-	-	-	-	-	

+) CML= Chloramphenicol; Kan= Kanamycin, Neo= Neomycin;
Stre= Streptomycin; Sid= Sulfanilamide; Ana= Anabactyl;
Amp= Ampicillin; Ceph= Cephalosporine

- c) 1. *Proteus morganii* ATCC 9916 sowie die Serotypen
558, V 24, 285, 319/1 Pfeiffer von Dr. Rauss,
Pécs, Ungarn (71)
2. *Proteus vulgaris* ATCC 9920
Proteus X 2 ATCC 6897,
Proteus OX 19 ATCC 881,
Proteus OX K ATCC 15141
3. *Proteus mirabilis* ATCC 9921
4. *Pseudomonas pyocyanea* G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8,
GA, GB, GC, GD, GE
von Dr. Gillies, Edingburgh (41)
5. *Salmonella*: 38 Serotypen (vgl. Resultate) am
Max von Pettenkofer-Institut aus klinischem
Material isoliert und von Dr. Rohde, Nationale
Salmonella-Zentrale, Hamburg, serotypisiert.
Ferner: *S. typhimurium* ATCC 13311
S. typhimurium LT 2 (Dr. Lebek, Bern)
6. *Shigella sonnei* (Glattform); Dr. Lebek
7. *Escherichia coli* A15R⁻ (Dr. Rösenthaller, Münster)
E. coli K12 meth⁺ R⁻ (Dr. Lebek)

8. *Klebsiella aerogenes* (aus klinischem Material;
Max von Pettenkofer-Institut)

9. *Micrococcus lysodeiicticus* (Dr. Ledoux,
Mol/Belgien)

2. Medien

a) Mueller-Hinton Broth

(Difco-Laboratories, Detroit)

Zusammensetzung:

auf 1000 ml aqua deion.

Beef Infusion von	300 g
-------------------	-------

Casamino Acids Technical	17,5 g
--------------------------	--------

Bacto - Soluble Starch	1,5 g
------------------------	-------

pH 7,4

Bei Verwendung als Agar

15 g Bacto-Agar (Difco Laboratories)

b) Tryptone-Soya Broth

(Ocid Ltd., London)

Zusammensetzung:

auf 1000 ml aqua dest.

Pancreatic Digest of Casein	17,0 g
-----------------------------	--------

(Ocid L42)

Papaic Digest of Soybean-Meal (Oxoid L44)	3 g
Sodium chloride	5 g
Dibasic potassium phosphate	2,5 g
Dextrose	2,5 g

pH 7,3

c) Tryptone-Soya Agar

(Oxoid Ltd., London)

Zusammensetzung:

auf 1000 ml aqua dest.

Tryptone (Oxoid L42)	15 g
Soya Peptone (L44)	5 g
Sodium chloride	5 g
Agar No. 3 (L13)	15 g

pH 7,3

d) Tryptic-Soy Agar

(Difco Laboratories, Detroit)

Zusammensetzung:

auf 1000 ml aqua dest.

Pancreatic Digest of Casein USP	15 g
Soy Bean Peptone	5 g
Sodium chloride	5 g
Bacto Agar	15 g

pH 7,3

e) Pepton-Agar

(Max von Pettenkofer-Institut, München)

Zusammensetzung:

auf 1000 ml aqua dest.

Agar	20 g
Pepton e carne trypt. "Merck"	25 g
NaCl	3 g
K ₂ HPO ₄	2 g

pH 7,4

3. Antibiotika: Mitomycin C

Herkunft: Serva, Heidelberg

Boehringer, Mannheim

for injection Kyowa, Hakko Kogyo Co.,

LTD, Tokio

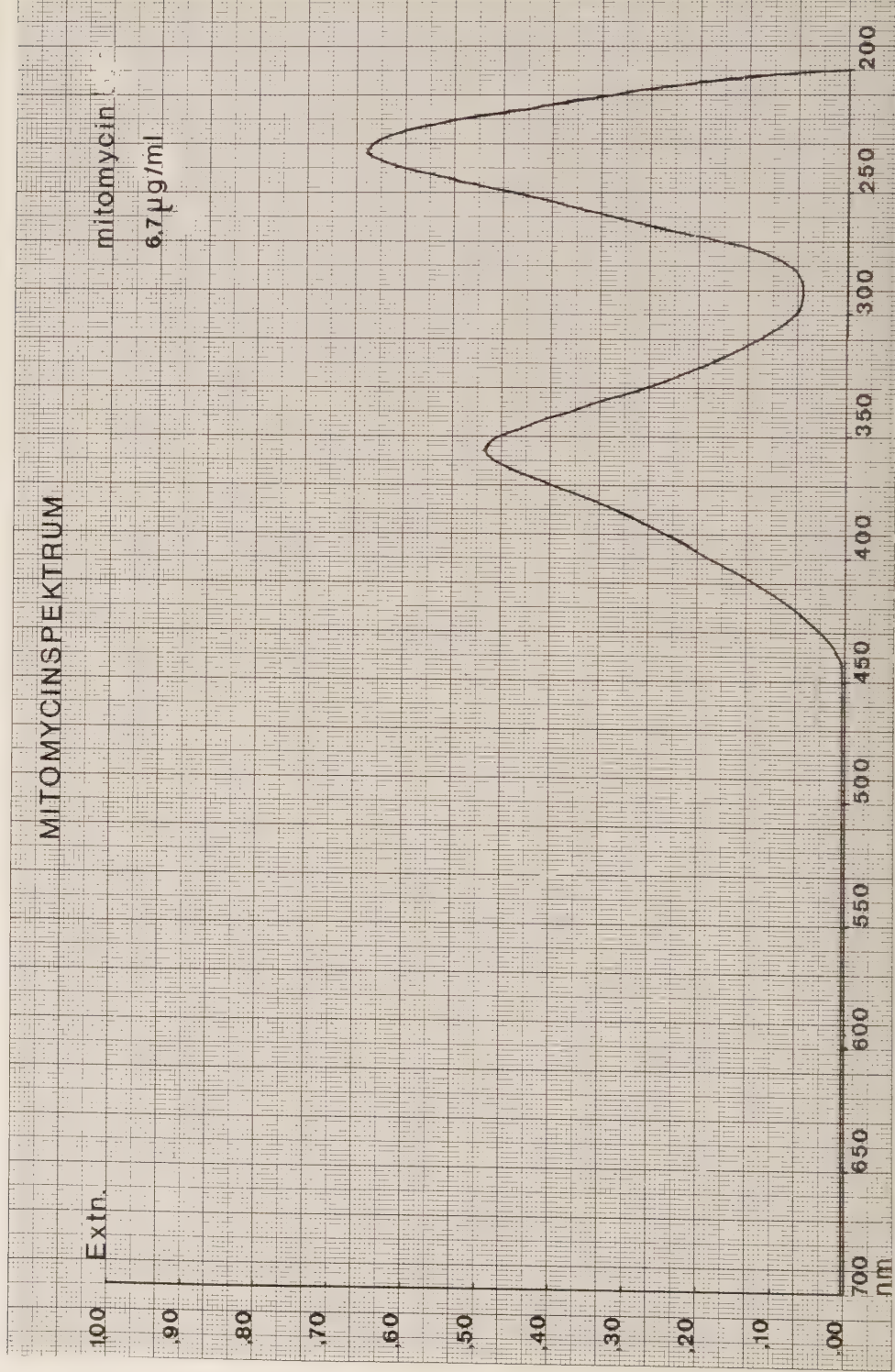
II. Methoden

1. Bestimmung der Mitomycinresistenz

Mitomycin C wurde gelöst in Methanol "Merck" p.A.
Seine Konzentration bestimmten wir über Extinktions-
messung bei einer Wellenlänge von 360 nm gegen
Methanol (Gilford-Spektrophotometer 240).

Dabei entsprach eine Extinktion von 742 Einheiten =
10.000 $\mu\text{g/ml}$ Mitomycin C

Darstellung: Extinktionsspektrum von Mitomycin C



Vorkulturen: Alle Stämme wurden in Mueller-Hinton Bouillon auf OD 0,1 eingimpft und 20 h bei 37°C bebrütet. Diese Suspensionen wurden mit demselben Medium wieder auf eine OD von 0,1 verdünnt, je 100 μ l davon auf die gesamte Fläche einer Peptonagarplatte gleichmäßig ausgespaltelt und 20 h bei 37°C bebrütet.

Peptonagarmedien wurde das Mitomycin C nach Autoklavieren und Abkühlen des Agars auf etwa 50°C in folgenden Konzentrationen zugegeben:

0,1 μ g/ml

0,25 μ g/ml

0,5 μ g/ml

1,0 μ g/ml

2,5 μ g/ml

5,0 μ g/ml

Von gleich dicht bewachsenen Stellen der wie oben beschriebenen hergestellten Bakterienrasen wurde mit einer geeichten 1 μ l-Oese jeweils etwa gleichviel Bakterienmaterial abgenommen und auf die Peptonagarmedien unterschiedlicher Mitomycinkonzentrationen ausgestrichen (Strichlänge 4 mm).

Bebrütung: 20 h bei 37°C.

2. Nachweis von Hemmsubstanzen mit der Ausstreichmethode

Hierzu wurde die von Gillies (41) zur Typisierung von *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen ausgearbeitete Methode modifiziert (41).

Wahl der Medien: Zunächst wurden Mueller-Hinton

Bouillon für Vorkulturen und Difco-TSA

als fester Nährboden verwendet. Nach-

dem ein erster Producerstamm gefunden

worden war, ermittelten wir unter folgen-

den Medien die für den Hemmsubstanz-

nachweis geeignetsten: Flüssige Medien:

Mueller-Hinton Bouillon, Oxoid-TSB.

Agarmedien: Difco-TSA, Oxoid-TSA,

Mueller-Hinton Agar, Peptonagar.

Methode: Im einzelnen wurde folgendermaßen verfahren

(9a):

Producer: Alle Stämme, die auf eine mögliche Bakterio-

zinsynthese hin zu untersuchen waren, wurden

in je 4 ml TSB auf eine OD von 0,1 eingimpft,
anschließend 20 h bei 37°C bebrütet.

Von diesen Vorkulturen wurden je 100 μ l auf
weitere 4 ml TSB umpipettiert.

Bebrütung im Schüttler (New Brunswick, Controlled Environment Incubator Shaker) bei 37°C und 200 U/min bis eine OD von 0,75 (Beckman Model C Colorimeter, 660 nm) erreicht war.

10 μl dieser Vorkulturen wurden im Zentrum einer Agarschale mit 20 ml Mueller-Hinton Agar 1,5% (Durchmesser der zentralen Kreisfläche: 50 mm) mit einer Platinoese ausgestrichen, und zwar nacheinander: Kreisförmig gegen den Uhrzeigersinn, kreisförmig im Uhrzeigersinn, um ein (möglichst) über die gesamte Fläche gleichmäßiges Producerwachstum zu bekommen (vgl. Abb. 1). Für jeden Stamm wurde neben einem mitomycinfreien Nährboden ein weiterer mit der jeweils optimalen Mitomycinkonzentration (vgl. Resultate) benutzt.

Nach Bebrütung über 16 h bei 32°C wurden die Producer von der Platte entfernt, die zurückgebliebenen Bakterien dann mit Chloroform abgetötet. Zum Verdampfen des Chloroforms wurden die Platten 15 min geöffnet in den Brutschrank (37°C) gelegt.

Indikatoren: Vorkulturen definierter optischer Dichte wurden mit der Kurzkante eines hochgestellten rechteckigen Platinspatels radiär auf die Producerplatten ausgestrichen, und zwar 8 Indikatoren pro Platte (vgl. Abb. 2).

Bebrütung: 17 h bei 37°C.

Abb. 1: Ausstreichen der Producer

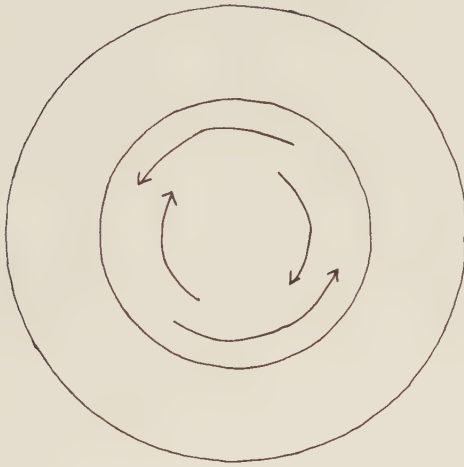
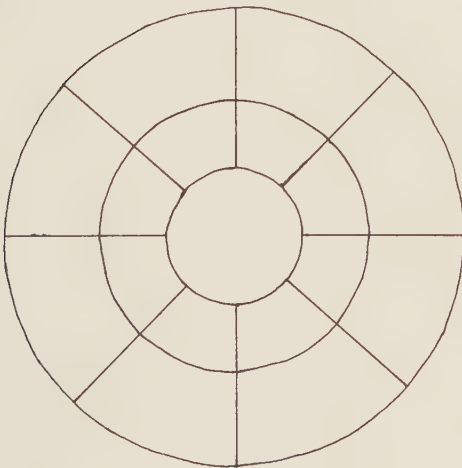


Abb. 2: Ausstreichen der Indikatoren



3. Bestimmung des Hemmstofftiters flüssiger Producerkulturen.

Medien: Peptonagar

Softagar: 0,7% Agar (Difco purified)

Mitomycin C in stamnesspezifischer Konzentration.

Vorbereitung der Producer: Über-Nacht-Vorkulturen der Stämme in TSB-(Oxoid) wurden auf eine OD von 0,05 mit demselben Medium verdünnt, mit Mitomycin C entsprechender Konzentration versetzt und bei 32°C unter Schütteln (150 U/min) 7 h lang und anschließend noch 16 h ohne Schütteln weiterbebrütet. Anschließend wurden die Bakterien 30 min bei 8000 U/min 4°C abzentrifugiert (Sorvall RC 2B). Im Überstand verbliebene Bakterien wurden abgetötet durch Ausschütteln mit 1/10 des Volumens an Chloroform.

Indikatoren: Frisch gewachsene Indikatorkulturen wurden zu je 2,5 ml Softagar gegeben (100 μ l, OD 0,025) und mit diesem über 20 ml verfestigtem Mueller-Hinton Agar als zweite Schicht ausgegossen. Nachdem der Softagar festgeworden war, wurden die Überstände der Producerkulturen bzw. Verdünnungen davon mit 10 μ l-Oesen ausgetropft. Dann wurde 13 h bei 37°C bebrütet.

4. Ausschluß von Bakteriophagen

a) Ausstreichmethode

Ein ermittelter Producer (J15, J13) wurde in der gleichen Art wie zur Typisierung vorbereitet, ausgestrichen und bebrütet (16h, 32°C). Der Producer-rasen wurde entfernt, das Medium chloroformiert. Auf die Agarplatte wurde dann jeweils 100 μ l der dazugehörigen Indikatorkulturen einer OD 0,025; 0,10 und 0,3 aufpipettiert und auf der Oberfläche des Nährbodens bis zum Plattenrand hin ausgespaltet. Anschließend wurde wie üblich bei 37°C inkubiert.

b) Diffusion

Hemmstoffhaltige Suspensionen wurden präpariert, wie unter 3. beschrieben. Im Unterschied zum Verfahren zur Titerbestimmung wurden hier in die Nährböden Löcher gestanzt und mit 90 μ l der vorbereiteten Producerlösung gefüllt. Nach 20 h Prädiffusion wurden erneut 20 μ l eingefüllt und alle Platten weitere 26 h stehen gelassen und dann nach Zugabe des Indikatorstammes bei 37°C bebrütet.

c) Gefriertrocknung

Die Producerüberstände (vgl. 3.) wurden folgendermaßen behandelt:

Dialyse gegen aqua deion. (Entfernen des Mitomycins und anderer niedermolekularer Bestandteile des Überstandes.)

Gefriertrocknung

Aufnehmen in 1 ml aqua deion.

Dialyse gegen physiologische NaCl

chloroformieren mit 1/10 des Überstandsvolumens

Mit der erhaltenen Lösung wurde wie unter 4. b) verfahren.

5. Aktivitätsspektrum

a) Stämme: vgl. I. 1. c)

b) Methode

Als Methode wurde das Ausstreichverfahren (vgl. 2.) angewandt.

Medien: Mueller-Hinton-Bouillon (Vorkulturen)

Difco-TSA (vgl. S. 18, 28)

Mitomycinkonzentrationen: wie unter 1.

C Ergebnisse

1. Mitomycinresistenz der Teststämme

Spontan wird Bakteriozin nur von einem kleinen Teil einer Population einer bakteriozinogenen Kultur gebildet, und zwar hauptsächlich während der logarithmischen Wachstumsphase (66). Die von einer Population einer - von einigen Ausnahmen abgesehen (49) - colicinogenen Kultur gebildete Bakteriozinmenge kann wesentlich erhöht werden durch Induktion. Dabei wird nicht die Menge Bakteriozin, die in einer Zelle gebildet wird, erhöht, sondern die Zahl der bakteriozinbildenden Zellen einer Population vergrößert. Die Induktion mit Mitomycin C ist der gebräuchlichste der chemischen Induktionswege. Induziert wird die bakteriozinogene Kultur am stärksten in der exponentiellen Wachstumsphase. Unmittelbare Anhaltspunkte für optimal induzierende Mitomycinkonzentrationen fehlten in unserem Fall zunächst, Producerstämme mußten ja erst gefunden werden, und zwar unter Induktion. Wir wählten deshalb zur Induktion jeweils die höchsten Konzentrationen an Mitomycin, bei der die Stämme in ihrer Vermehrung gerade noch nicht erkennbar gehemmt wurden. Dazu ermittelten wir zunächst die Resistenzhöhe gegenüber Mitomycin C durch Ausstreichen der Stämme auf festen Medien unterschiedlicher Mitomycinkonzentrationen.

Tabelle 2: Mytomycinresistenz (yg/ml) der Teststämme

	0	0,1	0,25	0,5	1	2,5	5
J1	+	+	+	+/-	-	-	-
J3	+	+	-/+	-	-	-	-
J4	+	+	+/-	-/+	-/+	-	-
J15	+	+	+	+	-/+	-	-
J8	+	+	+	+	+	-	+/-
J9	+	+	+	+	+	+	-
J10	+	+	+	+	+	+/-	-/+
J11	+	+	+	+	+	+/-	-
J13	+	+	+	+	+	+	+/-
J14	+	+	+	+	+	+	+/-
J21	+	+	+	-/+	-	-	-
J22	+	+	+	+	+/-	-/+	-
J23	+	+/-	+/-	-/+	-	-	-
J24	+	+	+	+	+	-/+	-
J25	+	+/-	+/-	+	+	-/+	-
J32	+	+	+	+	+	-/+	-
J36	+	+/-	+/-	-/+	-	-	-
J38	+	+	+	+/-	+/-	-/+	-
J42	+	+/-	+/-	-/+	-	-	-
J43	+	+	+	+	+	+	+/-
J44	+	+	+	+/-	-/+	-	-
J45	+	+	+	+	+	+	-/+
J46	+	+/-	+/-	-/+	-/+	-	-
J50	+	+	+	+/-	-/+	-	-
J51	+	+	+	+	+	-	-
J52	+	+	+	+	+	+/-	-/+
J55	+	+	+	+	+	+/-	-
J56	+	+	+	+/-	+/-	-	-
J57	+	+	+	+	+	-	-
J58	+	+	+	+	+	+	-/+
J67	+	+	+	+	+	-/+	-
J68	+	+	+	+	+	+/-	-/+
J74	+	+	+	+/-	+/-	-	-
J75	+	+	+/-	+/-	-/+	-	-
J86	+	+	+	+/-	-/+	-	-
J87	+	+	+	+	+	+/-	-
J90	+	+	+	+	+	+/-	-
J91	+	+	+	+	+	-	-
J95	+	+	+	+/-	+/-	-/+	-
M64	+	+	+	+/-	-/+	-	-
M115	+	+	+	+	+	+/-	-
M121	+	+	+	+	+	+/-	-
M199	+	+	+	+	+	+	+/-
M200	+	+	+/-	+/-	+/-	-/+	-
M318	+	+	+	+/-	-/+	-/+	-
M320	+	+	+	+	+	+	-

+: Wachstum wie ohne Mitomycin: Resistent

+/-: Wachstum leicht reduziert

-/+ : Wachstum stark reduziert

-: Kein Wachstum: empfindlich

Bei der niedrigsten hier eingesetzten Mitomycinkonzentration (0,10 yg/ml) wächst die Mehrzahl der Stämme wie auf mitomycinfreien Nährböden, lediglich J 23, J25, J36, J42, J46 waren leicht gehemmt. In Gegenwart von 5 yg/ml konnten sich nur noch wenige Stämme - und diese auch nur deutlich reduziert - vermehren (J8, J13, J14, J43, M199). Zwischen diesen beiden Werten der Konzentrationsreihe waren innerhalb der Teststämme deutliche Abstufungen in der Resistenzhöhe gegenüber Mitomycin erkennbar. Um die Untersuchung nicht unnötig aufwendig werden zu lassen, wurden - generalisierend - Stämme annähernd gleicher Mitomycinresistenzhöhe zu Gruppen zusammengefaßt:

Gruppe 1: 0,25 yg/ml: J10, J11, J13, J14, J22, J25, J38,
J43, J45, J52, J55, J56, J51, J57
J58, J67, J68, J74, J90, J95, M1,
M2, M11, M33, M43, M69, M115, M116
M121, M199, M313, M317, M318

Gruppe 2: 0,1 yg/ml: J1, J4, J15, J8, J9, J21, J23, J24,
J32, J36, J42, J44, J46, J50, J75
J86, J87, J91, M64, M70, M103, M200

Gruppe 3: 0,01 yg/ml: J3

Dabei legten wir die Mitomycinkonzentrationen niedriger, als auf Grund der Resistenztestung erforderlich gewesen wäre, und zwar aus folgendem Grund:

Die Bakterienkonzentration im Resistenztest lag höher als im Bakteriozintest, d.h. die erhaltenen Resistenzwerte müssen, wie sich auch experimentell zeigte, für niedrigere Einsaaten reduziert werden. Unter den Stämmen gleicher Mitomycinresistenz wurden einzelne Stämme (J9, J24, J32) in eine tiefere Gruppe, als ihrem Resistenzniveau entspricht, eingeordnet, da sie bereits auf mitomycinfreien Medien relativ schwaches Wachstum zeigten.

2. Bakteriozinsynthese und -sensitivität bei *Proteus rettgeri*

Ähnlich wie bei der Induktionskonzentration war bei der Auswahl der Medien wegen des Fehlens eines Producerstammes eine Optimierung zunächst nicht möglich. Die Menge eines produzierten Bakteriozins ist abhängig von der Zusammensetzung des Nährmediums (12). Komplex zusammengesetzte, reiche Medien begünstigen die Produktion, während arme Medien beschränken. Wir verwendeten deshalb in den ersten Serien gleichzeitig mehrere Medien, und zwar Peptonagar (als einfachster Nährboden), Difco Trypticase Soy Agar und Oxoid Trypticase Soy agar

(als geeignete Medien für die P y o c i n synthese von Gillies - 41 - empfohlen) sowie Mueller Agar als Medium, auf welchem die Stämme das beste Wachstum zeigten.

Da keine Korrelation zwischen der Fähigkeit zu Bakteriozinsynthese und anderen leicht erfaßbaren Eigenschaften bekannt ist, eröffneten wir die Suche nach Hemmstoffen, indem wir davon ausgingen, daß jeder Stamm mit gleicher Wahrscheinlichkeit zu Hemmstoffsynthese imstande sein könnte (ein Producer wäre). Wir kombinierten deshalb jeden Stamm in seiner vermuteten Rolle als Producer mit allen übrigen als - vermeintliche - einem eventuell synthetisierten Hemmstoff gegenüber empfindlichen Stämmen (Indikatoren). Dazu mußte, solange kein Producer zur Verfügung stand, mit den vier erwähnten Medien gearbeitet werden. Tatsächlich konnte nach aufwendigem Durchtesten von 31 Stämmen erstmalig bei Stamm J67 eine Hemmwirkung gegenüber dem Stamm J38 aufgefunden werden. Damit hatten wir die Möglichkeit, Medien und Methoden auf Nachweisempfindlichkeit zu optimieren. Was die Medien betrifft, so ließ sich die Hemmwirkung bei Verwendung von Peptonagar nicht nachweisen, auf Difco TSA und Oxoid TSA war sie gut, auf MH-Agar optimal erkennbar. Die Durchführung des Nachweisverfahrens wurde in seiner optimierten und standartisierten Form - wie sie nach dem Auffinden des ersten Producers erarbeitet werden konnte - im Methodenteil dargestellt.

Unter diesen Bedingungen gelang bei der Weiterführung des Screenings noch bei einer Reihe weiterer Stämme der Nachweis von Substanzen mit Hemmwirkung auf andere Stämme derselben Spezies.

Tabelle 3: Hemmspektren

I N D I K A T O R E N

J

M

	3	9	10	11	23	36	38	42	44	50	52	55	56	67	74	75	87	1	11	116	199	200
J1							+															
J4							+															
J67							+															
J15		+	+	+	+		+	+							+		+	+	+	+	+	+
J13		+			+	+	+									+						
M1																	+					
M43																	+					
M11										+		+					+					+
M69	+							+		+	+	+					+					
M103	+							+		+	+	+					+					+
M116	+							+		+	+	+		+			+					+
M318	+							+			+		+				+					

P
R
O
D
U
C
E
R

3. Charakterisierung der Hemmsubstanzen

a) Hemmspektren

Die gefundenen Hemmstoffe waren erst nach Induktion mit Mitomycin nachweisbar. Eine Ausnahme machte lediglich der Stamm M103. Wie aus Tab. 3 S. 32 ersichtlich, unterscheiden sich die meisten der ausgeschiedenen Hemmstoffe in ihren Wirkungsspektren voneinander, und zwar bereits mit Hilfe einer relativ kleinen Anzahl von Indikatoren.

Setzt man diese Aktivitätsspektren in Bezug zur Natur der ausgewählten Producerstämme (Tab. 1 S. 10), so wird deutlich, daß, dem Wirkungsspektrum nach, Substanzen gleichen Hemmspektrums von Stämmen unterschiedlichen Serotyps abgegeben werden können, so etwa von J1, J4 und J67 mit den Serotypen O3 : H1; O6 : H4; O29 : H 4. Zum anderen ließen sich bei Stämmen desselben Bio-, Sero- und Lysotyps Hemmstoffe verschiedenen Wirkungsspektrums nachweisen (Producerstämme M43, M103, M116; M69, M318). Stämme, die darüber hinaus auch noch den gleichen R-Faktor tragen, können trotzdem Hemmsubstanzen unterschiedlichen Wirkungsspektrums abgeben (M43, M116).

Zusammenhänge zwischen Bio-, Sero-, Lyso- und Resistenztyp einerseits sowie Sensitivität, d.h. der Indikatorfunktion andererseits, waren bei den hier eingesetzten Stämmen ebenfalls nicht erkennbar; Unterschiedliche Serotypen können im Sensitivitätsspektrum übereinstimmen (J10 und J11; J23, J36 und J75; J44 und J74; J3, J42, J52 und M1; M11, M199 und M200). Andererseits weichen Stämme des gleichen Sero- und Lysotyps in ihrem Indikatorverhalten voneinander ab: Nur M11 und M116 waren sensitiv gegen J15, die übrigen geprüften M-Stämme desselben Sero- und Lysotyps aber nicht.

Bemerkenswert erscheint ferner die Beobachtung, daß einzelne Stämme gleichzeitig Producer- und Indikatorfunktion haben können (J67; M1, M11, M116). Sie stimmen in ihrem Sensitivitätsspektrum überein, lassen sich aber ihren Producereigenschaften nach differenzieren.

Weder Producer- noch Indikatorfunktion zeigten die Stämme: J8, J14, J21, J22, J24, J25, J43, J45, J46 J51, J57, J58, J68, J86, J90, J91, J95, M2, M33, M64, M70, M115, M121, M313, M317.

Die Hemmwirkung der von uns gefundenen Substanzen, im folgenden dem Vorschlag für die Nomenklatur von Bakteriozinen folgend *R e t t g e r o c i n e* genannt, auf Stämme *i n n e r h a l b* der Spezies *Proteus rettgeri* ging aus Tab. 3 S. 32 hervor (12). Dabei fällt die unterschiedliche Breite der Spektren von Hemmstoffen verschiedener Producer auf: Zwischen nur einem gehemmten Indikatorstamm (J1, J4, J67; M1 = M43) bis zu 11 beim Produzenten J15. Da die Zahl der hier verwendeten Stämme begrenzt, ihre Natur weitgehend zufällig ausgewählt ist, erschien uns die Charakterisierung der Hemmsubstanzen nach ihren Wirkungsspektren noch unzureichend. Weitere Stämme von *Proteus rettgeri* standen uns zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung. Wir erweiterten deshalb unsere Untersuchung auf andere gramnegative Stämme sowie *M. lysodeicticus*.

Die Wirkung der Hemmsubstanzen ging demnach im allgemeinen nur wenig über die Grenzen der Art hinaus; lediglich einer der von Gillies für die Pyocintypisierung eingeführten Indikatorstämme (G4) erwies sich als sensitiv gegenüber einzelnen *Proteus rettgeri* M-Produzenten.

Völlig aus dem Rahmen hingegen fällt das Rettgerocin J15: Es zeichnete sich nicht nur durch das breiteste Hemmspektrum innerhalb der eigenen Spezies aus, auffallender noch ist seine Wirkung speziell auf Salmonellen. Dabei erwiesen sich Stämme unterschiedlicher Serotypen, nämlich der Gruppen A, B, C1, C2, C4, D1, G1 und J als sensitiv. Unwirksam blieb RJ15 gegen zwei unter 11 Vertretern der Gruppe B sowie sämtlichen hier untersuchten Serotypen der E-Gruppen (5). Die mögliche Bedeutung dieses Befundes wird später diskutiert.

Tabelle 4: Hemmspektrum von J15 bei Salmonellen

Gruppe	Spezies	Antigenformel +)	
A	S.paratyphi A	(1), 2, 12 : a : -	+
	S.paratyphi B (O-Form)	1, 4, 5, 12 : - : -	-
	S.schottmülleri	(1), 4, 5, 12 : b : 1, 2	+
	S.abony	(1), 4, 5, 12 : b : e, n, x	-
	S.wien	(1), 4, 12, (27) : b : 1, w	-
	S.saint-paul	(1), 4, 5, 12 : e, h : 1, 2	-
	S.derby	(1), 4, 5, 12 : f, g : $\frac{1}{2}$	+
	S.agona	(1), 4, 12 : f, g, s : -	+
	S.essen	4, 12 : g, m : -	+
	S.typhimurium	(1), 4, 5, 12 : i : 1, 2	+
B	S.bredeney	(1), 4, 12, (27) : l, v : 1, 7	+
	S.brandenburg	(1), 4, 12 : l, v : e, n, z	+
	S.heidelberg	(1), 4, 5, 12 : r : 1, 2	15 +
	S.coleypark	6, 7 : a : 1, w	+
	S.braenderup	6, 7 : e, h : e, n, z	15 +
	S.oranienburg	6, 7 : m, t : -	+
	S.thompson	6, 7 : k : 1, 5	+
	S.potsdam	6, 7 : l, v : e, n, z	15 +
	S.infantis	6, 7 : r : 1, 5	+
	S.barailly	6, 7 : y : 1, 5	+
	S.mikawasina	6, 7 : y : e, n, z	15 +
C ₁			
	S.münchen	6, 8 : d : 1, 2	+
	S.newport	6, 8 : e, h : 1, 2	+
	S.kottbus	6, 8 : e, h : 1, 5	+
	S.blockley	6, 8 : k : 1, 5	+
	S.litchfield	6, 8 : e, v : 1, 2	+
C ₂	S.bovis morbificans	6, 8 : r : 1, 5	+
C ₄	S.eimsbüttel	6, 7, (14) : d : 1, w	+
D ₁	S.typhi (14 Stämme)	9, 12, y : d : -	+
	S.enteritidis	(1), 9, 12 : g, m : -	+
	S.panama	(1), 9, 12 : l, v : 1, 5	+
E ₁	S.butantan	3, 10 : b : 1, 5	-
	S.münster	3, 10 : e, h : 1, 5	-
	S.anatum	3, 10 : e, h : 1, 6	-
	S.westhampton	3, 10 : g, s, t : -	-
	S.london	3, 10 : l, v : 1, 6	-
G ₁	S.poona	(1), 13, 22 : z : 1, 6	+
I	S.gaminara	16 : d : 1, 7	+

+) O-Antigen: H-Antigen Phase I: H-Antigen Phase II

b) Bakteriophagenausschluß

Wie bei anderen bakteriozinproduzierenden Spezies muß auch bei *Proteus rettgeri* mit lysogenen Stämmen gerechnet werden. Bei ihnen könnte unter Mitomycineinwirkung ein lytischer Zyklus induziert werden (31). Sind derart vermehrte Phagen imstande, die verwendeten Indikatorstämme als Wirte zu benützen, so würden, ähnlich wie bei Synthese eines Bakteriozins, sensitive Stämme im Wachstum gehemmt werden. Wir legten deshalb im folgenden bei der Analyse der Hemmsubstanzen besonderen Wert auf Ausschluß von Bakteriophagen als für die Indikatorhemmung verantwortlichem Prinzip. Hierzu wurden zwei verschiedene Verfahren benützt.

aa) Ausstreichmethode

Mit dem Producerstamm wird dabei wie üblich verfahren (Material und Methoden). Einen bekannten Indikator verteilten wir nach Entfernen des Produccerasens gleichmäßig über die gesamte Oberfläche des Nährbodens aus. Nach Bebrütung der ausgespatelten Indikatoren zeichnete sich eine scharfe Begrenzung des Indikatorrasens ab: Nur im Bereich eines peripheren Rings konnten sich die Indikatorzellen vermehren, zentral, kongruent mit der Fläche vorausgegangenen

Producerwachstums, war der Indikator bis auf vereinzelte Kolonien gehemmt. Diese erwiesen sich bei weiterer Analyse als gegen die Hemmsubstanz des Producers resistente Mutanten des Indikatorstammes. Der Indikatorrasen außerhalb der Hemmzone war auch unter Lupenvergrößerung (5fach) völlig geschlossen. Keinerlei begrenzte Aufhellungen oder Aussparungen, d.h. Andeutungen von Plaques waren zu finden. Wäre die Ursache für das ausbleibende Wachstum des Indikatorstammes innerhalb der zentralen Fläche ein Bakteriophage des Producers, dessen Wirtsbereich den Indikator umfaßt, müßte man sowohl beim Entfernen des Producers als auch beim Ausspalteln des Indikators über die Oberfläche des Mediums einzelne Phagenpartikel vom Zentrum des Nährbodens mit in die Peripherie verschleppt haben. Dann müßten auch außerhalb der Zone des vorangegangenen Producerwachstums Wachstumshemmzonen, etwa in der Form von Plaques sichtbar werden. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen waren auch keine temperenten Phagen der Indikatorstämme erkennbar, d.h. die Rasen der Indikatorstämme allein auf mitomycinhaltigen Medien blieben ebenfalls frei von Plaques (Rasenmethode), vgl. oben), die peripheren Abschnitte der radiären Striche (Strichmethode) waren geschlossen.

bb) Diffusion

Hierzu wurde verfahren, wie unter Material und Methoden angegeben. Diese Methode erlaubt eine Unterscheidung zwischen Bakteriozinen und Bakteriophagen auf Grund der leichteren Beweglichkeit kleinerer Proteinmoleküle, wie die Bakteriozine in Agarmedien. Bakteriophagen diffundieren hingegen schlecht in Agarnährböden.

Diffundierbarkeit der Hemmsubstanz ließ sich im unbehandelten Überstand folgender Producerstämme nachweisen: J1, J15, M1, M11, M69, M103, M116, M318. Dabei ergaben sich deutliche Unterschiede der Hemmhofdurchmesser. Die unterschiedliche Größe der Hemmzonen konnte sowohl auf abweichende Molekülgröße als auch auf verschiedene Konzentrationen des Bakteriozins zurückzuführen sein. Deshalb wurde vor weiteren Diffusionsexperimenten die Konzentration des Überstandes an Bakteriozin mit Hilfe eines geeigneten Indikatorrasens austitriert (Material und Methoden). Es zeigten sich, für unbehandelte Suspensionen, beträchtliche Unterschiede in den Titerhöhen.

Tabelle 5: Hemmwirkung verdünnter Produceerüberstände

	J1	J4	J15	J13	J67	M1	M11	M43	M69	M103	M116	M318
1 : 1	2+	-	4+	-	+/-	2+	2+	-	3+	2+	3+	2+
1 : 5	+	-	3+	-	-	+	+	-	+	2+	2+	+
1 : 25	+/-	-	2+	-	-	+/-	-	-	+/-	+	+	+
1 : 50	-	-	2+	-	-	-	-	-	-	+/-	-	+/-

Da nur Suspensionen mit hohem Titer nach Diffusion in den Agar große und deutliche Hemmzonen bewirkten, liegt die Annahme nahe, daß bei Producern mit fehlender Hemmzone lediglich die Konzentration des Bakteriozins zu niedrig war, um den Indikator zu hemmen und so ein Bakteriophage nur vorgetäuscht wäre. Deshalb wurden Suspensionen dieser Producer durch Gefriertrocknen und Wiederaufnehmen in kleine Volumina konzentriert. Für den Nachweis der Diffundierbarkeit und damit des Bakteriozincharakters war eine Anreicherung erforderlich bei J4 und J13. Bei M43 konnte trotz dieser Maßnahme keine Diffundierbarkeit nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurde das gleiche Volumen sterilen Mediums derselben Mitomycinkonzentration identisch behandelt. Desgleichen der Überstand einer Kultur eines nicht bakteriozinbildenden Stammes.

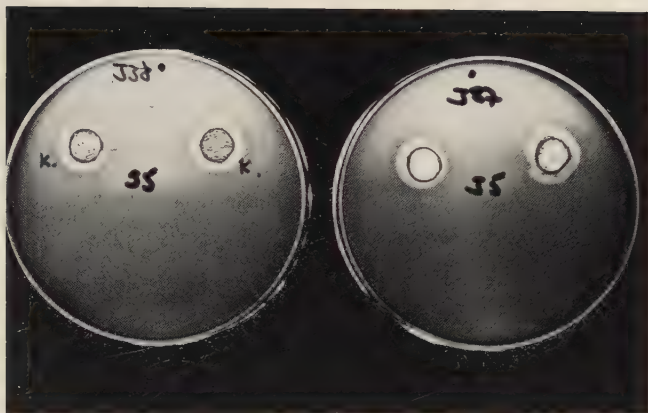


Abb. 3: Hemmstoffdiffusion in Agar
 Producer: J15; Indikatoren: J38, J87.
 Rechter Hemmhof doppelte Menge an Überstand.
 Mitomycin: 0,1 yg/m.

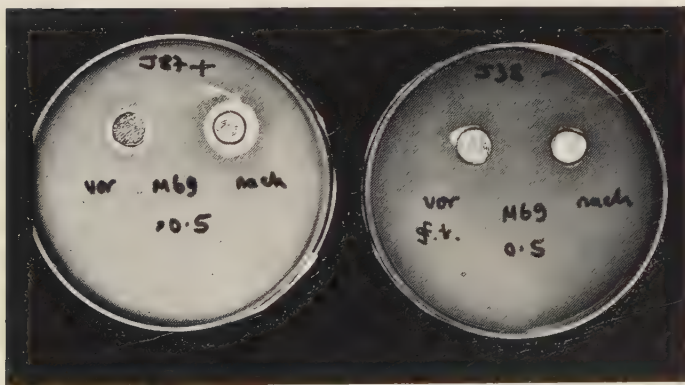


Abb. 4: Hemmstoffdiffusion in Agar
 Producer: M69; empfindlicher Stamm J87;
 unempfindlicher Stamm J38; jeweils rechter
 Hemmhof nach Konzentration durch Gefriertrocknung.
 Mitomycin: 0,5 yg/ml.

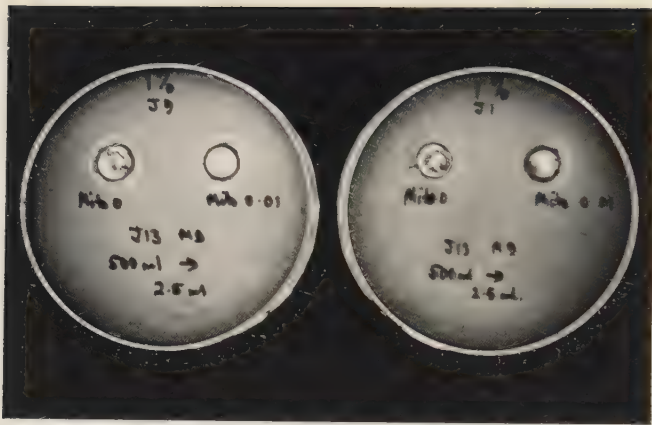


Abb. 5: Hemmstoffdiffusion in Agar
 Producer: J13; empfindlicher Stamm J1;
 unempfindlicher Stamm J1;
 Mitomycin: links jeweils 0,75 µg/ml,
 rechts jeweils 0,01 µg/ml.

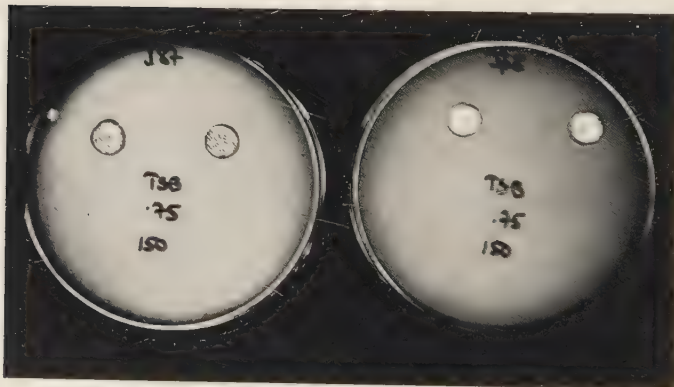


Abb. 6: Hemmstoffdiffusion in Agar
 Kontrolle für reinen Mitomycineffekt:
 Indikatoren: J87, J38;
 Mitomycin: 0,75 µg/ml.

D Diskussion

Bakteriozinogenie ist nach bisherigen Erkenntnissen nicht gekoppelt mit einem anderen experimentell erkennbarem Merkmal der betreffenden Stämme (S. 33). Steht man, wie bei *Proteus rettgeri*, völlig am Anfang der Suche nach Bakteriozinen, wobei unsicher ist, ob sie im gegebenen Stammmaterial überhaupt vorkommen (15), so sind alle ausgewählten Stämme sowohl auf Producer- als auch auf Indikatorverhalten hin zu testen. Diese Suche nach gleichzeitig zwei Merkmalen ist theoretisch insofern erhöhte Erfolgswahrscheinlichkeit, als in ein und demselben Stamm beide Merkmale gegeben sein können (Synthese eines Bakteriozins, Empfindlichkeit gegenüber das von einem anderen Stamm produzierte). Ein Risiko der Leerarbeit lag in möglicher genetischer Identität gesammelter Stämme. Um dieses Risiko möglichst niedrig zu halten, hatten wir für unsere Untersuchungen bevorzugt Stämme ausgewählt, die sich in anderen Merkmalen voneinander unterschieden, so etwa in ihrer Antigenstruktur. Von ihnen kann angenommen werden, daß sie im Lipopolysaccharidteil der Zellwand Unterschiede aufweisen; einer Zellstruktur also, die neben den Rezeptoren für Antikörper und Bakteriophagen auch diejenigen für Bakteriozine trägt. Wie aus dem Ergebnisteil ersichtlich, läßt sich auch an unserem Stammmaterial keinerlei Beziehung zwischen Serotyp und Bakteriozintyp erkennen: U n t e r s c h i e d l i c h e

Serotypen bilden - nach unseren bisherigen Kriterien - identische Rettgerocine. Stämme desselben Serotyps, andererseits Hemmstoffe abweichenden Wirkspektrums. Damit ist die Bakteriozino g e n i e bei *Proteus rettgeri* als vom Serotyp unabhängige Eigenschaft zu betrachten. Sie gewinnt so die Qualifikation eines eigenständigen epidemiologischen Markers (vgl. unten: Bakteriozinotypie bei *Proteus rettgeri*). Von uns (8) isolierte Stämme eines im Münchner Klinikbereichs gehäuft auftretenden Typs von *Proteus rettgeri* sind mit großer Wahrscheinlichkeit per Kreuzinfektion verbreitet worden. Dabei traten jedoch offenbar Veränderungen im extrachromosomalen Genbestand ein, erkennbar an den Bereichen des Resistenzbildes, die plasmiddeterminiert sind. So eröffnete sich eine Möglichkeit, nach Zusammenhängen evtl. Koppelung zwischen Resistenzdeterminanten und ebenfalls extrachromosomal liegenden Determinanten für Bakteriozino-genie zu suchen. Auf Grund dieser Überlegung hatten wir unterschiedliche Resistenztypen von *Proteus rettgeri* München in die Untersuchung einbezogen. Dabei ergaben sich an unserem Material keine schlüssigen Hinweise auf Zusammenhänge zwischen Resistenzplasmiden und Bakteriozinogenie: Sowohl unter dem R^- - als auch unter den R^+ -Stämmen finden sich nicht bakteriozinogene. Unter den R^+ -Stämmen bei allen drei verschiedenen Resistenztypen, d.h. unabhängig von der Art der Determinanten der jeweiligen Resistenzplasmide. Neben der Bakteriozino g e n i e ist Bakteriozin s e n s i - t i v i t ä t auf ihre Eignung als epidemiologisch

verwertbares Kriterium zu prüfen. Bei diesem Merkmal erscheinen Beziehungen zu Antigenstruktur oder Phagenrezeptoren. Sie deuten sich bei unseren Stämmen einmal an, und zwar bei M11 und M116. Obwohl im Bio-, Sero- und Lysotyp übereinstimmen, liegen mit Sicherheit nicht zwei Kopien desselben Stammes vor: Sowohl Antibiotogramm, als auch Bakteriozinogenie weichen voneinander ab. Die Seltenheit dieses Zusammentreffens von Sero- und Lysotyp sowie Bakteriozinsensitivität macht eine Koppelung dieser Marker unwahrscheinlich. Zudem ist die Auswahl der Producer, die uns für die Prüfung übereinstimmender Sensitivität vorliegen, noch relativ klein. Mit zusätzlichen Producer-typen könnte sich das Bild differenzieren. Da zudem bei allen übrigen Stämmen keine Zusammenhänge zwischen Bakteriozinsensitivität und anderen Eigenschaften deutlich wurden, erscheint auch dieses Merkmal als epidemiologischer Indikator geeignet.

Hemmspektren

Bestandteil der Definition eines Bakteriozins ist die Begrenzung seiner Aktivität: "in general active on some other strains of the same or related species (REEVES, 1972), "...dessen Wirkung begrenzt ist auf einen engen Komplex verwandter Arten, durch die Gegenwart spezifischer Rezeptoren bedingt ist." (JACOB, 1953) "...die ein spezifisches

Stammwirkungsspektrum aufweisen, das überwiegend auf andere Stämme der eigenen Art beschränkt ist" (BRANDIS, 1975). Spezifität der Wirkung der Bakteriozine ist auch Voraussetzung für ihre Brauchbarkeit als Klassifizierungsmerkmal in Form der Bakteriozinotypie. Die von uns gefundenen Stoffe mit Bakteriozincharakter entsprechen in der Regel auch im obengenannten Kriterium den Vorstellungen von einem Bakteriozin; für R-J15 jedoch nur mit Einschränkung: Seine Wirkung reicht über die eigene Art hinaus auf die Spezies *Salmonella*. Beide Spezies werden zwar den Enterobakteriaceae zugerechnet, unterscheiden sich aber in der Zusammensetzung ihrer Desoxyribonucleinsäure beträchtlich: Der Guanin + Cytosinanteil liegt bei den Salmonellen zwischen 50 und 54%, bei *Proteus rettgeri* zwischen 39 und 42% (5). In diesem Falle lassen sich also die bakteriozinspezifischen Rezeptoren nicht in Einklang mit den Vorstellungen über phylogenetische Verwandtschaftsgrade bringen. Unmittelbar benachbart wären natürlich *Proteus vulgaris* oder *Proteus mirabilis* derselben Spezies (und etwa mit gleich großen GC-Gehalt ihrer DNS - 58 -).

Die Spezifität des Wirkungsspektrums von R-J15 erscheint nicht nur durch die Inaktivität gegenüber anderen Enterobakteriaceae (auch innerhalb derselben Spezies (vgl. Tab. 4 S. 37) gegeben, sondern auch auf Grund der

bemerkenswerten Aussparungen innerhalb der Salmonellen: S. abnoy, S. wien, S. saintpaul aus der B-Gruppe verfügen offenbar nicht über spezifische R-J15 Rezeptoren. Läßt sich hier eine deutliche Beziehung zur Antigenstruktur nicht erkennen, so fällt das einheitliche Verhalten der untersuchten Serotypen der beiden E-Gruppen (E1 und E4) auf: Allen R-J15 resistenten Serotypen gemeinsam ist die O-Antigendeterminante 3. Damit wird mit einem anderen Kriterium als dem der serolytischen Analyse die Einheitlichkeit dieser Gruppe bestätigt, zum anderen ein möglicher Zusammenhang zwischen Bakteriozinsensitivität und Serotyp aufgezeigt. Inwieweit die Existenz der O3 Komponente Vorhandensein oder Zugänglichkeit eines R-J15-spezifischen Rezeptors ausschließt, wird durch weitere Untersuchungen aufzuklären sein.

Bakteriophagenausschluß

Die Bakteriozine haben in vielen Punkten große Ähnlichkeit mit Bakteriophagen. Beide führen zum Absterben der Zellen, in denen sie gebildet werden (10, 12). Ihre Produktion kann ebenfalls durch UV-Licht (10) und Mitomycin C induziert werden. Beide werden an Fixationsrezeptoren der Zelloberfläche empfindlicher Zellen adsorbiert. Die Rezeptoren für Bakteriophagen sitzen jedoch nicht an der zytoplasmatischen Membran, sondern in der Zellwand (79).

Zwischen einigen Bakteriozinen und Bakteriophagen besteht sogar Kreuzresistenz, in dem Sinn, daß Bakterienzellen, die gegen bestimmte Bakteriozine resistent geworden sind, gleichzeitig auch resistent wurden gegen bestimmte Bakteriophagen (34). Von einigen Bakteriozinen wird angenommen, daß es sich um defekte Bakteriophagen handelt, die unfähig sind, einen vollen Wachstumszyklus zu durchlaufen und oft nur aus einer Proteinhülle bestehen, aber durch Adsorption Bakterien töten können. Dazu gehören das Colicin E. coli 15 und die Pyocine A2 und A3. Es ist gelungen, im Elektronenmikroskop die Struktur solcher Bakteriozine darzustellen. Colicin E. coli 15 hat kleinköpfige Struktur mit kontraktilem Schwanz, die Pyocine A2 und A3 sind kopflose, kontraktile Schwänze (31, 51, 60, 74).

Bakteriozine unterscheiden sich von Bakteriophagen dadurch, daß sie keine Nukleinsäure enthalten und sich daher auch nicht vermehren können (13). Diese Eigenschaft wird hauptsächlich benutzt, um nachzuweisen, daß eine beobachtete Wachstumshemmung nicht von Bakteriophagen, sondern von Bakteriozinen ausgeht. Unsere Wachstumshemmstoffe waren - Producer M103 ausgenommen - erst nach Mitomycin-induktion nachweisbar. Damit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für Phageninduktion. Die Ergebnisse des Ausstreichverfahrens (vgl. Material und Methoden) ließen jedoch Bakteriophagen als Ursache der Hemmwirkungen mit großer

Sicherheit ausschließen. Die gute Diffusionsfähigkeit der Hemmsubstanzen ist ein zusätzliches Phagenausschlußkriterium, insbesondere nach dem von uns bei *Proteus rettgeri* isolierte Phagen als Kontrolle eingesetzt wurden. Nach Abschluß dieser Arbeit durchgeführte Molekulargewichts-, Dichte- und elektronenmikroskopische Analysen von vorläufig einem der hier gefundenen Hemmstoffe bestätigen dessen Bakteriozincharakter.

Bakteriozinotypie bei *Proteus rettgeri*

Bei der Typisierung von Stammkollektiven mit Hilfe von Bakteriozinen geht man davon aus, daß sowohl die Fähigkeit zur Synthese von Bakteriozinen als auch die Sensitivität gegenüber diesen Stoffen genetisch stabile Merkmale eines bestimmten Stammes sind, die unter definierten Bedingungen sicher erfaßbar sind. In dem für *Ps. pyocyaneus* von Gillies (41) ausgearbeiteten und in der Praxis, zumindest was die Haupttypen betrifft, bewährten Verfahren erfolgt die Klassifizierung auf Grund Bakteriozinsyntheseleistung der zu typisierenden Stämme. Die produzierten Bakteriozine werden mit einem Satz von Indikatorstämmen charakterisiert. Einer, einige oder alle dieser Stämme werden von Pyocin (oder den Pyocinen) des Producer gehemmt (soweit davon überhaupt ein Pyocin synthetisiert wird bzw. das Empfindlichkeitsspektrum des Indikatorsatzes das Pyocin des

Producers auch wirklich einschließt).

Würde man nach diesem Prinzip eine Klassifizierung der von uns zunächst bearbeiteten 56 Stämme von *Proteus rettgeri* vornehmen, so käme man zu folgender Einteilung:

Tabelle 6: Bakteriozintypen bei *Proteus rettgeri*

Indikatoren							
	J9	J38	J50/55	J56	J67	J87	M200
M1, M43	-	-	-	-	-	+	-
M116	-	-	+	-	+	+	+
M103, M11	-	-	+	-	-	+	+
M69	-	-	+	-	-	+	-
M318	-	-	-	+	-	+	-
J1, J4, J67	-	+	-	-	-	-	-
J15	+	+	-	-	-	+	-
J13	+	+	-	-	-	-	-

Dabei wurde versucht, mit einer minimalen Zahl von Indikatorstämmen - sie war ja ebenso wie die Producerstämmen von uns ebenfalls erst zu finden - die von uns gefundenen verschiedenen Producer in Typen zu gruppieren.

Die 12 Producerstämmen lassen sich demnach in 8 verschiedene Typen unterteilen. Dabei können die Stämme M1 und M43, M103 und M11 sowie J1, J4 und J67 zu jeweils einer Gruppe zusammengefaßt werden. Damit ist zum erstenmal gezeigt, daß eine Klassifizierung dieser Spezies über Bakteriozinsynthese im Prinzip möglich ist. Der Anteil, der über Bakteriozinsynthese typisierbaren Stämme an der Gesamtzahl der in unsere Untersuchung einbezogenen, ist für eine praktische Verwertbarkeit zu niedrig (12/56 : 21,4%).

Im ausgewählten Stammkollektiv dieser Spezies ist die Fähigkeit zur Synthese von Bakteriozinen ein, verglichen etwa mit der bei *Ps. pyocyanea*, relativ seltenes Ereignis (41). Das ist nicht erstaunlich insofern, als dort eine Induktion zur Synthese überhaupt nicht erforderlich ist, ganz im Gegensatz zu den Verhältnissen bei den bisher untersuchten Stämmen von *Proteus rettgeri*. Unter ihnen tritt nach unseren bisherigen Ergebnissen nur in Ausnahmefällen (M103) Bakteriozin in nachweisbarer Konzentration ohne Induktion auf.

Nun beruht eine Klassifizierung nach Producertypen ja auf zwei Merkmalen, wenn auch bei verschiedenen Stämmen: Der Synthese von und der Sensitivität gegenüber einem bestimmten Bakteriozin.

Beide Merkmale müssen, wie ausgeführt, genetisch stabil sein, damit reproduzierbare Resultate möglich sind. Das legt den Gedanken nahe, nicht nur die Synthesefähigkeit, sondern auch die Sensitivität als charakteristisches Merkmal für eine Klassifizierung heranzuziehen; dies umso mehr, als ein bemerkenswerter Anteil der untersuchten Stämme Indikatorfunktion, und zwar ausschließlich diese aufweist. Der Prozentsatz ist natürlich bestimmt von der Zahl der im untersuchten Stammkollektiv gefundenen Producer. Bei einer größeren Zahl von Stämmen wächst auch die Zahl der erhaltenen Producer mit charakteristischen Aktivitätsspektren. Dadurch wird die Menge der über Indikatorfunktionen typisierbaren Stämme zunehmen. Typisierung per Indikatorfunktion bietet sich, wie am vorliegenden Material, immer dort an, wo erkennbar wird, daß Producereigenschaften selbst nach Induktion vergleichsweise seltene Merkmale sind.

Für unser Stammkollektiv läßt sich über die Indikatorfunktion die folgende Klassifizierung erarbeiten:

Tabelle 7: Bakteriozinsensitivität bei *Proteus rettgeri*

P R O D U C E R

	J13	J15	M69	M103	M116	M318	J67
J10, J11, J44, J74 M1, M11, M116, M199	-	+	-	-	-	-	-
J23, J36, J75	+	-	-	-	-	-	-
J56	-	-	-	-	-	+	-
J67	-	-	-	-	+	-	-
J9	+	+	-	-	-	-	-
M200	-	-	-	+	-	-	-
J3, J42, J52	-	-	+	+	+	+	-
J50, J55	-	-	+	+	+	-	-
J38	+	+	-	-	-	-	+
J87	-	+	+	+	+	+	-

I N D I K A T O R E N

Nimmt man beide Klassifizierungswege, Producer und Indikatorfunktion, zusammen, dann resultiert ein typisierbarer Anteil von $12/56 + 22/56 = 34/56$; davon jedoch in beiden Gruppen auftreten: M1, M11, M116, J67; d.h. im Endeffekt $30/56 = 53,6\%$.

Dieser Anteil ist in Abetracht des hier erstmals unternommenen Versuches einer Klassifizierung bei dieser Spezies nach Bakteriozinen bemerkenswert hoch. Es wird hiermit erstmalig aufgezeigt, zu einer epidemiologisch äußerst bedeutsamen Bakteriozinotypie dieser Spezies zu gelangen.

Weiterführung dieser Untersuchungen mit zusätzlichen Stämmen geographisch verschiedener Herkunft läßt berechtigt erwarten, daß weitere Producertypen gefunden werden könnten, mit deren Hilfe der Prozentsatz der klassifizierbaren Stämme auf eine für die epidemiologische Praxis hinreichender Höhe gebracht werden kann. Es zeichnet sich somit die Möglichkeit ab, der epidemiologischen Praxis ein zusätzliches Instrument zur Analyse der Infektionswege der hospitalhygienisch bedeutsamen Spezies *Proteus rettgeri* zur Verfügung zu stellen.

E Zusammenfassung

Unter 56 Stämmen der Spezies *Proteus rettgeri* konnten bei 12 Stoffe nachgewiesen werden, die imstande waren, andere Stämme derselben Spezies in ihrem Wachstum zu hemmen.

Es konnte sichergestellt werden, daß es sich bei diesen Hemmsubstanzen nicht um Bakteriophagen, sonder um Bakteriozine handelt.

Bei einem der gefundenen Bakteriozine erstreckt sich die Wachstumshemmwirkung auf zahlreiche Serotypen der Gattung *Salmonella*.

Mit Hilfe der hier erstmals bei einer großen Zahl typischer Stämme dieser Spezies beschriebenen Bakteriozine, R E T T G E R O C I N E genannt, konnte ein vorläufiges Klassifizierungsschema auf Bakteriozinbasis für diese hospitalhygienisch bedeutsamen Erreger erstellt werden.

L i t e r a t u r

1. ABBOTT, J.D., GRAHAM, J.M.: Colicine typing of *Shigella sonnei* Monthly Bull. Minist. Health. Lab. Serv. 20, 51 (1961)
2. ABBOTT, J.D., SHANNON, R.: A method for typing *Shigella sonnei* using colicine production as a marker. J. clin. Path. 11, 71 (1958)
3. ADLER, M., BURKE, M., FINLAND, M.: Infection and antibiotic usage at Boston City Hospital. Arch. Intern. Med. 127, 460 (1971)
4. AMATI, P.: Role of host bacteria in inducibility of Colicin J production by ultraviolet light. Biochem. biophys. Acta 74, 783 (1963)
5. BAK, A.L.: DNA Base Composition in *Mycoplasma*, Bacteria and Yeast. Cur. Top. Microbiol. Immunol. 61, 89 - 149 (1973)
6. BARBER, M., WATERWORTH, P.M.: Antibiotic sensitivity of *Proteus* species. J. clin. Path. 17, 69 (1964)

7. BAUERNFEIND, A.: Harnwegsinfektionen durch *Proteus rettgeri*. Fortschr. Med. 13, 588 (1973)
8. BAUERNFEIND, A.: Kreuzinfektionen der Harnwege durch einen neuen Typ von *Proteus rettgeri*. Habilitationsschrift an der Medizin. Fak. der Ludwig Maximilians-Universität: München (1973)
9. BAUERNFEIND, A., HAUPT, S.: Erregerspektrum bei Bakteriurien männlicher und weiblicher erwachsener Patienten. "Der Urologe", Ausgabe A 11, 90 94 (1972)
- 9a. BAUERNFEIND, A. PETERMÜLLER, C., BURROWS, J.R.: Standardization of pyocin-typing. In Vorbereitung
10. BEN GURION, R.: Induction of colicines. Zbl. Bact. I Abt. Orig. 196, 183 (1965)
11. BLACKBURN, T.H.: The production and reactions of some colicines. Thesis. Dublin (1961)
12. BRADLEY, D.E., DEWAR, C.A.: The structure of phage-like objects associated with non-induced bacteriocinogenic bacteria. J. gen. Microbiol. 45, 399 (1966)

13. BRANDIS, H., SMARDA, J.: Bacteriocine und bacteriocin-
ähnliche Substanzen. Fischer-Verlag (1971)
14. BRANDIS, H.: Purification and Characterization of two
Bacteriocins from *Streptococcus faecium*. (1971)
15. BREED, R.S.: Bergey's Manual of Determinative Bacterio-
logy. Baillière, Tindall & Cox, LTD. London (1957)
16. BROD, J.: Infektionswege bei Pyelonephritis in:
LOSSE, H., KIENITZ, M.: Pyelonephritis. THIEME,
Stuttgart (1907)
17. BURKE, J.P., INGALL, D., KLEIN, J.O., GEZON, H.M.,
FINLAND, M.: *Proteus mirabilis* infections in a
hospital nursery traced to a human carrier. New. Engl.
J. Med. 284, 115 (1971)
18. CHAPPLE, P.J.: Elektrophoresis of colicines in agar
gel. Nature (London) 195, 1325 (1962)
19. CLOWES, R.C.: Transmission and elimination of colicin
factors and some aspects of immunity to Colicin El in *E.*
coli. Zbl. Bakt. I Abt. Orig. 196, 152 (1965b)

20. CRADDOCK, J.E., TRAUB, W.H.: Bacteriocinogenity in *Proteus rettgeri*. *Experientia* (Basel) 27, 980 (1971)
21. CRADDOCK, J.E., WATSON: The production of bacteriocines by *Proteus* species. *Zbl. Bact. I Abt. Orig.* 196, 385 (1965)
22. CREEVY, C.D., PRICE, W.E.: Chloromycetin and Gantrisin in the treatment of Urinary infections. *J. Urol.* (Baltimore) 72, 1233 - 1237 (1954)
23. DARRELL, J.H., WAHBA, A.H.: Pyocine-typing of hospital strains of *Ps. ae.* *J. clin. Path.* 17, 236 (1964)
24. DE GRAAF, F.K.: Purification and Genetic Determination of Bacteriocin Production in *Enterobacter cloacae*.
25. DESAUTELS, R.E.: The causes of catheter-induced urinary tract infections and their prevention. *U. Urol.* (Baltimore) 101, 757 (1969)
26. DÖRKEN, H.: Studien bei gehäuftem Auftreten von Harnwegsinfekten durch *Proteus vulgaris*. *Zbl. Gynäk.* 72, 81 (1950)

27. DOTTON, A.A.C., RALSTON, M.: Urinary tract infections in a male urological ward with special reference to the mode of infection. *Lancet* 1, 115 (1957)
28. EDEBO, L.: Hospital Infections of the Urinary tract with *Proteus*. *Acta path. microbiol. scand.* 43, 93 (1958)
29. EDWARDS, L.D.: Outbreak of a Nosocomial Infection with a strain of *Proteus rettgeri* resistant to many Antimicrobials. *Amer. J. clin. Path.* 61, 41 (1974)
30. EICKHOFF, T.C.: Surveillance of nosocomial infections in community hospitals. *J. Infect. Dis.* 120, 305 (1969)
31. ENDO, H., AYABE, K., AMAKO, K., TAKEYA, K.: Inducible phage of *E. coli* 15. *Virology* 25, 469 (1965)
32. FREDERICQ, P.: Sur la destruction des colicines par les protéases microbiennes. *C.r. Soc. biol.* 142, 403 (1948a)
33. FREDERICQ, P.: Actions antibiotiques réciproques chez les *Enterobacteriaceae*. *Rev. belge Path. exp. Méd. exp.* 19 suppl. 4, 1 (1948c)

34. FREDERICQ, P., GRATIA, A.: Résistance croisée à certaines colicines et à certains bactériophages. C.R. Soc. Biol. (Paris) 143, 560 (1949)
35. FREDERICQ, P.: Transduction genetique des proprietets colicinogenes chez E. coli et Sh. sonnei. C.R. Soc. Biol. (Paris) 148, 399 (1954)
36. FREDERICQ, P.: Genetics of two different mechanisms of resistance to colicins: Resistance by loss of specific receptors and immunity by transfer of colicinogenic factors. Ciba Found. Symp. Drug Resistance of Microorganisms p. 232(1957a)
37. FREDERICQ, P.: Transduction of colicinogenity, Annr. rep. Carnegie inst. Washington 57, 396 (1958)
38. FREDERICQ, P.: Transduction par bactériophage des propriétés colicinogènes chez Salmonella typhimurium. C.R. Soc. Biol. (Paris) 153, 357 (1959)
39. FREDERICQ, P.: A note on the classification of colicines. Zbl. Bact. I Abt. Orig. 196, 140 (1965a)

40. FREDERICQ, P.: Genetics of colicinogenic factors.
Zbl. Bact. I Abt. Orig. 196, 142 (1965b)
41. GILLIES, R.R., GOVERN, J.R.W.: Typing of Ps. ae. by
pyocine production. J. Path. Bact. 91, 339 (1966)
42. GRATIA, A.: Sur un remarquable exemple d' antagonisme
entre deux Souches de colibacille. C.R. Soc. Biol.
(Paris) 93, 1040 (1925)
43. V.GRAEVENITZ, A.: Observations on indole-positive
Proteus. Yale J. Biol. Med. 41, 434 (1969)
44. HALBERT, S.P., MAGNUSON, H.J.: Studies with antibiotic-
producing strains of E. coli. J. Immunol. 58, 397
(1948)
45. HAMON, Y.: Contribution à l' étude des pyocines.
Ann. Inst. Pasteur 91, 82 (1956)
46. HAMON, Y.: Contribution à l' étude des propriétés
lysogènes et bactériocinogènes dans le genre Pseudo-
monas. Ann. Inst. Pasteur 101, 738 (1961)

47. HARDY, P.C., EDERER, G.M., MATSEN, J.M.: Contamination of commercially packaged urinary catheter kits with the *Pseudomonad* EO-1. *New. Engl. J.Med.* 282, 33 (1970)
48. HEATLEY, N.G., FLOREY, H.W.: An antibiotic from *Bacterium coli*. *Brit. J. exp. Path.* 27, 378 (1946)
49. HERRSCHMANN, H.R., HELSINSKI, D.R.: Comparative study of the events associated with colicin induction. *J. Bact.* 94, 691 (1967a)
50. HOLLOWAY, B.W.: Grouping *Ps. ae.* by lysogenicity and pyocinogenity, *J. Path. Bact.* 80, 448 (1960)
51. IIISHII, S., NISHI, Y., EGAMI, F.: The fine structure of pyocine *J. mol. Biol.* 13, 428 (1965)
52. JACOB, F. LWOFF, A. SIMONOVITSCH, L., WOLLMANN, E.L.: Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur* 84, 224 (1953)
53. KASS, E.H., SCHNEIDERMAN, J.: Entry of bacteria into the urinary tracts of patients with indwelling catheters. *New. Engl. J. Med.* 256, 556 (1957)

54. KRAMER, J., BRANDIS, H.: Mode of Action of two Str. faecium Bacteriocins. Antimicrob. Agents Chemot. 7, 2 (1975)
55. LOOPUYT, L.: Infections of the Urinary tract. Acta medicá scand. 125, 245 (1946)
56. MAYR-HARTING, A.: The adsorption of colicine. J. Path. Bact. 87, 255 (1964a)
57. MAYR-HARTING, A.: Some Observations on colicin receptors. Zbl. Bact. I Abt. Orig. 196, 263 (1965)
58. MARMUR, J., DOTY, P.: Determination of the Base Composition of Deoxyribonucleic Acid from its Thermal Denaturation Temperature. J. Mol. Biol. 5, 109 - 118 (1962)
59. MC GEACHIE, J.: Bacteriocin typing in urinary infection. Zbl. Bact. I Abt. Orig. 196, 377 (1965)
60. MENNINGMANN, H.D.: On the nature of the inducible antibacterial agent of E. coli 15. Zbl. Bact. I Abt. Orig. 196, 207 (1965)
61. MITCHELL, J.P., GILLESPIE, A.W.: Bacteriological complications from the use of urethral instruments: principles of prevention. J. clin. Path. 17, 492 (1964)

62. NAGEL DE ZWAIG, R., LURIA, S.E.: Genetics and physiology of colicin-tolerant mutants of *E. coli*. *J. Bact.* 94, 1112 (1967)
63. NAMIOKA, S., SAKAZAKI, R.: Étude sur les *Reittgerella*. *Ann. Inst. Pasteur* 94, 485 - 499 (1958)
64. OMLAND, T.: Nosocomial Urinary tract Infections caused by *Proteus rettgeri*. *Acta Path. Microbiol. scand.* 48, 221 (1960)
65. ONDARZA, R.: Hospitalismus Enke, Stuttgart 1964
66. OZEKI, H., STOCKER, B.A.D., DE MARGERIE, J.: Production of colicine by single bacteria. *Nature, London* 184, 337 (1959)
67. PAPA VASSILIOU, J.: Colicinotypes and colicinogenotypes of 78 strains of *E. coli* isolated from calves. *Arch. Inst. Pasteur hellén* 8, 63 (1962)
68. PENNER, J.L., HINTON, N.A., HENNESSY, J.: Biotypes of *Proteus rettgeri*. *J. clin. Mikrobiol.* 1, 136 - 142 (1975)

69. PERCH, B.: Sensitivity of *Proteus* and *Providentia* to 8 Antibiotics a. Sulfathiazole. *Acta path. microbiol. scand.* 35, 278 (1954)
70. POTE, E.G., WRIGHT, S.S., FINLAND, M.: In vitro Susceptibility of Recently Isolated strains of *Proteus* to ten Antibiotics. *J. Lab. clin. Med.* 44, 463 (1954)
71. RAUSS, K., VÖROS, S.: The Biochemical and Serological Properties of *Proteus morganii*. *Acta microbiol. Acad. Hung VI*, 3, 233 - 248 (1959)
72. REEVES, P.R.: *The Bacteriocines*. Springer-Verlag, Berlin 1972
73. REPLOH, H., OTTE, H.J.: *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1968
74. SONDOVAL, H.K., REILLY, H.CH. TANDLER, B.: Colicin 15: possibly a defective bacteriophage. *Nature*, London 205, 522 (1965)
75. SANDFORD, J.P.: Hospital acquired urinary tract infections. *Ann. intern. Med.* 60, 903 (1964)

76. SCHWARZ, H., SCHIRMER, H.K.A., EHLERS, B., POST, B.:
Urinary tract infections: corelation between organisms
obtained simmultaineously from the urine and feces of
patients with bacteriuria and pyuria. J. Urol.
(Baltimore) 101, 765 (1969)
77. SCOTT, W.W.: Blood stream infections in Urology.
J. Urol. (Baltimore) 21, 527 (1929)
78. SHANNON, R., HEDGES, A.J.: Kinetics of lethal adsorption
of Colicin E2 by E. coli. J. Bact. 93, 1353 (1967)
79. SMARDA, J., TAUBENECK, U.: Situation of colicin
receptors in surface layers of bacterial cells. J. gen.
Microbiol. 52, 161
80. STORY, P.: Proteus infections in hospital. J. Path.
Bact. 68, 55 (1954)
81. TAGG, J.R.: Bacteriocin of an Group B Streptococcus:
Partial Purification and Characterization. Antim. Ag.
Chemot. 7, 6 (1975)
82. TRAUB, W.H.: Isolation of an antibiotic-restant, lactose-
fermenting strain of Pr. rettgeri. Experientia (Basel)
26, 437 (1970)

83. TRAUB, W.H., CRADDOCK, M.E., RAYMOND, E.A.:

Characterisation of an unusual strain of *Proteus rettgeri* associated with an outbreak of nosocomial urinary tract infections. *Appl. Microbiol.* 22, 278 (1971)

84. TRAUB, W.H., RAYMOND, E.A., STARTSMAN, T.S.:

Bacteriocin typing of clinical isolates of *Serratia marcescens*. *Appl. Microbiol.* 21, 897 (1971)

85. UMEZAWA, H.: Recent Advances in chemistry and biochemistry of antibiotics. Missin, Tosho Insadsu C. Tokio 176, (1964)

86. WERNER, H.P., WILDERMANN, G., FLAMM, H:

Angewandte Hygiene im Krankenhaus, 2. Aufl. Göschl, Wien - München (1972)

Danksagung

Meinen aufrichtigen Dank möchte ich Herrn Priv. Doz.
Dr. A. B a u e r n f e i n d aussprechen für die Über-
lassung des Themas sowie die Anregungen und Ratschläge,
die mir bei meinem Arbeiten eine wertvolle Hilfe waren.

Es sei mir erlaubt, dem Direktor des Max - von -
Pettenkofer - Instituts für Hygiene und med. Mikrobiologie
der Universität München, Herrn Professor Dr. Dr. E y e r ,
für die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit am Institut
ergebenst zu danken.

Besonders danken möchte ich auch Frau Ch. P e t e r m ü l l e r
und Fräulein J. B u r r o w s für ihre Mühe und Rat-
schläge.

Lebenslauf

Am 28. Juni 1952 wurde ich in Ebersberg als Tochter des Sattlers Lorenz Hellinger und seiner Ehefrau Cäcilie Hellinger, geb. Strobl, geboren.

Ab 1958 besuchte ich die Volksschule in Ebersberg, anschließend das Gerhardinger-Gymnasium in München, an dem ich im Juni 1971 das Abitur ablegte.

Von Oktober 1971 - November 1977 studierte ich Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität München, wo ich am 27.10.1977 die ärztliche Prüfung ablegte.

